

Estudio del proceso de transformación del colágeno en gelatina

POR

M. C. Bonmatí Limorte y G. León Albert

RESUMEN

Se ha realizado un estudio del proceso de transformación de colágeno en gelatina utilizando la viscosidad reducida como parámetro de control. Se ha observado una gran influencia de la temperatura y del tiempo de calentamiento sobre este proceso, así como sobre la temperatura de desnaturalización. Se han determinado igualmente las entalpía y entropía de desnaturalización.

SUMMARY

A study of the process of conversion of collagen to gelatin has been carried out using reduced viscosity as indicative parameter. We have observed an important influence of temperature and heating time on that process as well as on denaturalization temperature. Denaturalization enthalpy and entropy have been also determined.

INTRODUCCION

El colágeno, el más común de los componentes orgánicos de los tejidos conectivos (tejidos relacionados fundamentalmente con aspectos es-

tructurales y mecánicos del organismo animal), es el material estructural dominante en el reino animal. Se encuentra en los tejidos de todos los tipos de organismos pluricelulares, desde los pluricelulares invertebrados más primitivos hasta el hombre. Es, sin duda, la proteína más abundante en los mamíferos, encontrándose en una proporción aproximada del 25 % de la proteína total.

La molécula de colágeno —tropocolágeno— es una macromolécula muy alargada, en forma de varilla, constituida por tres cadenas polipeptídicas, de unas 1.000 unidades aminoacídicas cada una, arrolladas entre sí constituyendo una triple hélice estabilizada fundamentalmente por interacciones o enlaces por puente de hidrógeno.

Es conocido desde hace tiempo que cuando los tejidos colaginosos se calientan a temperaturas moderadas en agua o en disoluciones acuosas de ácidos o bases se disuelven parcialmente, dándose, a la porción de proteína solubilizada, el nombre genérico de gelatina.

Puesto que ese calentamiento suave solamente puede provocar la ruptura de los enlaces de hidrógeno que estabilizan la triple hélice del colágeno, el proceso de transformación de colágeno en gelatina puede ser considerado como un proceso típico de desnaturalización que, en este caso, supone tan sólo el desmoronamiento de la estructura triple hélice del colágeno nativo, sin afectar para nada a la estructura primaria de la proteína. La estructura de la gelatina resulta ser, por lo tanto, altamente simplificada con relación a la del colágeno, estando constituida por las cadenas originarias de la molécula de aquél, pero en un claro ordenamiento al azar.

La anterior hipótesis ha sido comprobada por los autores del presente trabajo en un estudio llevado a cabo sobre colágeno y gelatina obtenidos a partir de un mismo material biológico, observando que las composiciones aminoacídicas de ambos son prácticamente idénticas, mientras que existe una gran diferencia en las propiedades relacionadas de alguna manera con aspectos estructurales de niveles superiores de la molécula proteica en disolución.

En el presente trabajo se ha estudiado este proceso de desnaturalización aceptando que la transformación de colágeno en gelatina está íntimamente relacionada con la variación del valor de determinadas propiedades fisicoquímicas, reflejo de la estructura de la molécula proteica en disolución. Como parámetro indicativo de este proceso de desnaturalización se ha seleccionado la viscosidad reducida.

PARTE EXPERIMENTAL

El colágeno utilizado en este estudio se obtuvo a partir de tendón de ternero de la raza frisona (*Holstein frisia*).

El material biológico se cortaba en trozos lo más pequeños posible (aproximadamente cubitos de unos 0,5 cm de lado), lavándose éstos varias veces con agua destilada. El lavado con agua se continuaba prolongadamente con el fin de eliminar los componentes solubles en ella, realizándose, cuando menos, tres tratamientos de lavado sucesivos, de 4 horas cada uno, con agitación continua. Para eliminar acompañantes proteicos solubles en sales, el material biológico se trataba a continuación con cloruro sódico al 10 % (1) (4 lavados de 10 horas, con agitación continua).

Después de lavar varias veces con agua destilada, y con el objeto de eliminar los componentes lipídicos del material de partida, el residuo insoluble en la etapa anterior se trataba con éter de petróleo (4 lavados de 10 horas, con agitación continua). El material insoluble se lavaba de nuevo varias veces con acetona y agua, pasándose a continuación a extraer selectivamente el colágeno con tampón ácido cítrico/citrato, de $\text{pH} = 3,6$ (2). Después de tres extracciones sucesivas de 12 horas de duración (agitando continuamente), los extractos se unían y se filtraban con un embudo de vidrio sinterizado número 2, centrifugando seguidamente el filtrado a 8.000 g, durante 2 h. El sobrenadante se dializaba frente a fosfato disódico 0,02 M (3), obteniéndose el colágeno precipitado en forma de fibras. Con objeto de purificar este colágeno así obtenido, se extraía de nuevo —después de lavar varias veces con agua y centrifugar— con tampón cítrico-citrato de $\text{pH} = 3,6$, repitiendo todo el proceso antes indicado. Una vez vuelto a lavar y a centrifugar, se dejaba secar al aire. Todas las etapas del proceso seguido, de obtención y purificación, así como el secado y almacenamiento, se realizaron a 5° C.

Porciones alícuotas de una disolución del 0,043 % de colágeno en tampón ácido cítrico-citrato, $\text{pH} = 3,6$, se calentaron a 30, 36, 37, 38, 39 y 41° C, durante 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 y 90 minutos, pasándose seguidamente a determinar su viscosidad reducida a 30° C.

La medida de la viscosidad de las disoluciones se realizó siguiendo básicamente la técnica descrita por Kragh (4), con utilización de un viscosímetro Ostwald. A partir de las medidas de tiempo y de acuerdo con la proporcionalidad existente entre viscosidad y tiempo (se admite que en estas disoluciones tan diluidas la densidad de la disolución es aproximadamente igual a la del disolvente puro) se obtiene la viscosidad reducida mediante la expresión.

$$\eta_{\text{red}} = \frac{t - t_0}{t_0 \cdot c}$$

donde t es el tiempo de flujo de la disolución, t_0 el tiempo de flujo del disolvente puro (ambos en segundos) y c la concentración proteica (gramos por mililitro).

No se aplicaron a las medidas realizadas las correcciones debidas a energía cinética, flujos anómalos cercanos a la pared del viscosímetro, tensión superficial y drenaje, por ser las condiciones experimentales las adecuadas para minimizar hasta valores totalmente despreciables los errores inherentes a estos efectos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Puede apreciarse, en el examen de los resultados obtenidos (tabla I), que el proceso de desnaturalización supone la disminución de la viscosidad reducida desde un valor inicial constante con el tiempo (para nosotros el determinado a 30° C), que representa la totalidad de la proteína en estado nativo (es decir, cuando no se ha iniciado la desnaturalización) hasta otro valor igualmente constante (el determinado a 41° C), que representa la totalidad de la proteína en estado desnaturalizado (es decir, cuando se ha completado el proceso de desnaturalización). Los valores intermedios de la viscosidad reducida representan etapas o estados también intermedios en el proceso de desnaturalización, en los que coexisten distintas proporciones de colágeno nativo y colágeno desnaturalizado.

TABLA I

VALORES MEDIOS A DISTINTOS TIEMPOS Y TEMPERATURAS DE LA VISCOSIDAD REDUCIDA DE UNA DISOLUCION DE COLAGENO DE TENDON DE TERNERO (CONCENTRACION 0,043% EN TAMPON CITRICO-CITRATO DE pH 3,6)

Temperatura (°C)	Valores de viscosidad reducida (ml/g)							
	Tiempo (minutos)							
	5	10	15	20	30	45	60	90
30	1.483	1.480	1.482	1.485	1.482	1.484	1.483	1.482
36	1.410	1.296	1.154	1.071	942	829	786	715
37	1.207	923	768	685	498	386	307	248
38	552	265	205	149	89	72	68	69
39	230	77	69	68	67	69	68	67
41	70	68	69	67	68	68	69	68

De acuerdo con lo anterior, hemos de admitir que el proceso de transformación de colágeno en gelatina se encuentra muy influenciado por la temperatura a la que el mismo tenga lugar (fig. 1). Así, a temperaturas de 36 a 37° C, el tránsito se realiza de forma gradual e incompleta, llegándose a un estado de equilibrio en el que coexisten colágeno nativo y colágeno desnaturalizado en determinadas proporciones (54 % de gelatina y 46 % de colágeno a 36° C, y 87 % de gelatina y 13 % de colágeno a 37° C). Por el contrario, a temperaturas iguales o superiores a 38° C el tránsito es ya muy rápido y prácticamente total.

Para caracterizar de una forma completa el proceso de desnaturalización de una proteína es necesario conocer algunos parámetros característicos, como son temperatura, entalpía y entropía de desnaturalización.

Si se tiene en cuenta que la *temperatura de desnaturalización* de una proteína se define como aquella temperatura a la que se ha desnaturalizado el 50 % de las moléculas —lo que corresponde a un 50 % de variación de la viscosidad reducida—, es posible calcular la temperatura de desnaturalización del colágeno representando el porcentaje de disminución de la viscosidad reducida frente a la temperatura y determinando, en la gráfica así obtenida, la temperatura a la que se ha producido el 50 % de disminución (fig. 2).

Los resultados así obtenidos (tabla II) ponen de manifiesto la gran dependencia entre el valor de la temperatura de desnaturalización y el tiempo de calentamiento, observándose que al aumentar éste disminuye la temperatura de desnaturalización. Se hace, pues, necesario, al hablar de una temperatura de desnaturalización, especificar la temperatura de calentamiento a la que ha sido obtenida.

TABLA II

VARIACION DE LA TEMPERATURA DE DESNATURALIZACION (T_D)
CON EL TIEMPO DE CALENTAMIENTO (t)

$t(\text{min})$ $T_D (^\circ\text{C})$	5	10	15	20	30	45	60	90
	37,67	37,21	36,95	36,75	36,42	36,13	35,98	35,95

No obstante, puede también apreciarse (tabla II, fig. 3) que las diferencias entre las temperaturas de desnaturalización disminuyen al aumentar el tiempo de calentamiento, pudiéndose considerar, en el presente caso, prácticamente constantes las obtenidas para tiempos de calentamiento iguales o superiores a 60 minutos.

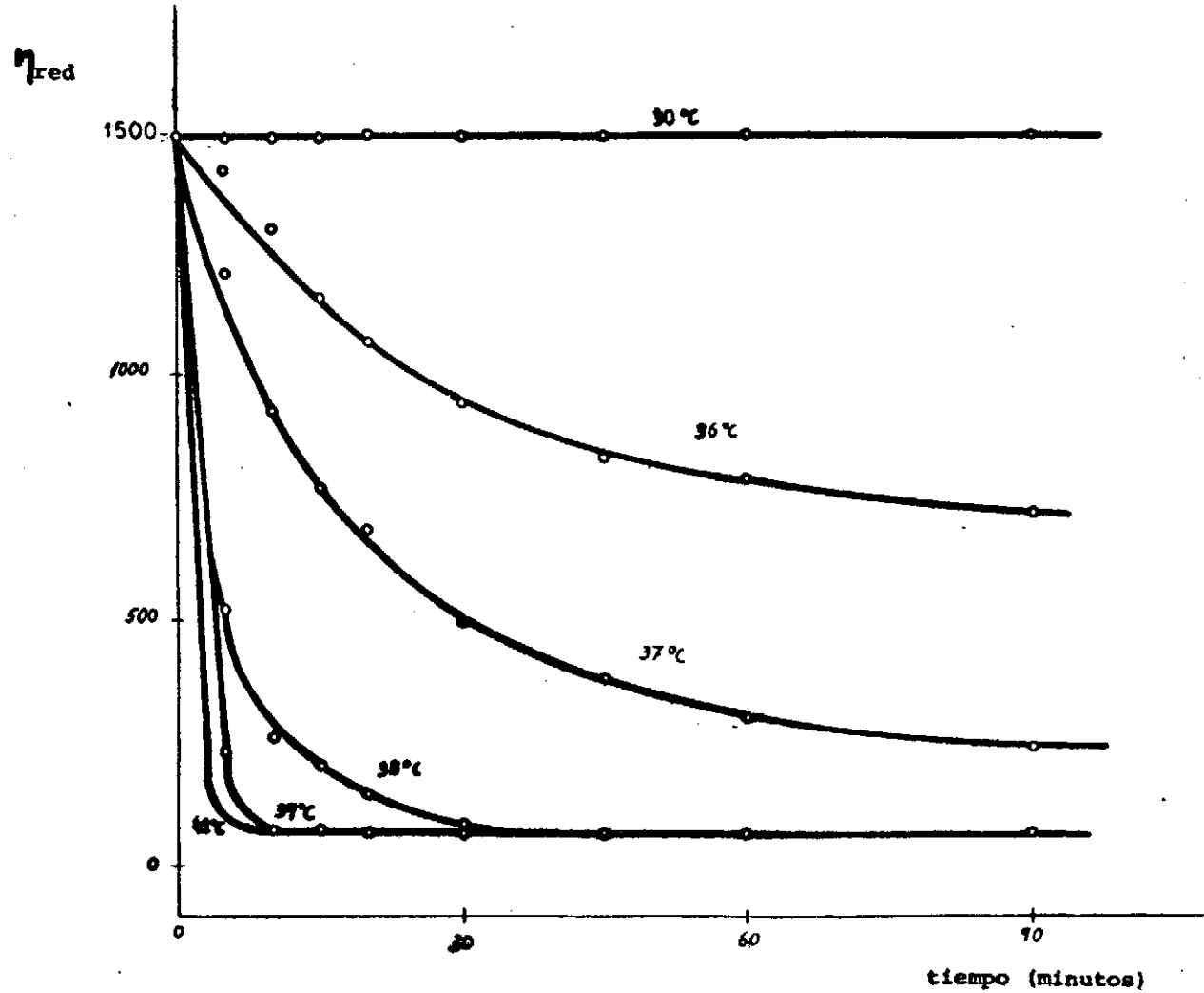


FIGURA 1.—Variación de la viscosidad reducida con el tiempo para distintas temperaturas de calentamiento.

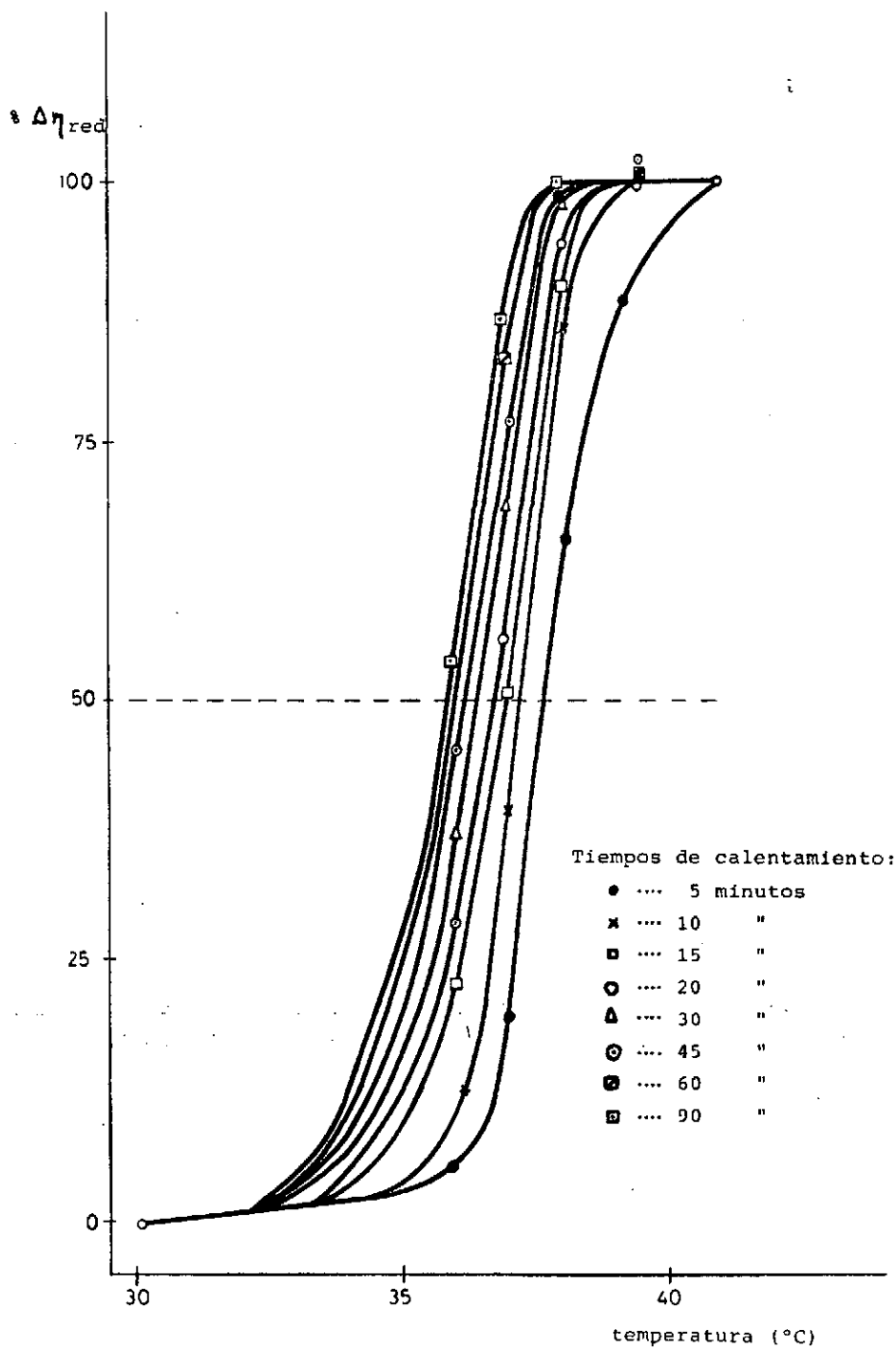


FIGURA 2.—Porcentaje de variación de la viscosidad reducida ($\% \Delta \eta_{red}$) con la temperatura para distintos tiempos de calentamiento.

Esto sugiere la posibilidad de definir una temperatura de desnaturalización independiente de la velocidad de calentamiento por extrapolación a tiempo infinito de las obtenidas a distintas velocidades de calentamiento. Tal temperatura de desnaturalización independiente del tiempo es para el caso del colágeno de tendón de ternero la de 35,95° C.

El segundo parámetro de interés que caracteriza el proceso de desnaturalización es la *entalpía de desnaturalización* (ΔH_D) que viene a ser una medida de la variación energética que se produce como consecuencia de la ruptura de las interacciones por puente de hidrógeno.

Si admitimos que el proceso de desnaturalización tiene lugar en una sola etapa (proteína nativa \rightleftharpoons proteína desnaturalizada), puede considerarse regido por la ecuación de Van't Hoff:

$$\log K = \text{cte.} - \frac{\Delta H_D}{2,303 RT}$$

donde K es la constante del equilibrio de transición entre la proteína en estado nativo y la proteína en estado desnaturalizado:

$$K = \frac{[\text{proteína desnaturalizada}]}{[\text{proteína nativa}]}$$

La representación de $\log K$ frente a $\frac{1}{T}$ da una recta de cuya pendiente obtenemos la entalpía de desnaturalización.

En la tabla III se indican los porcentajes de proteína en estado nativo y proteína en estado desnaturalizado para cada temperatura y tiempo de calentamiento obtenidos a partir del porcentaje de variación de la viscosidad reducida.

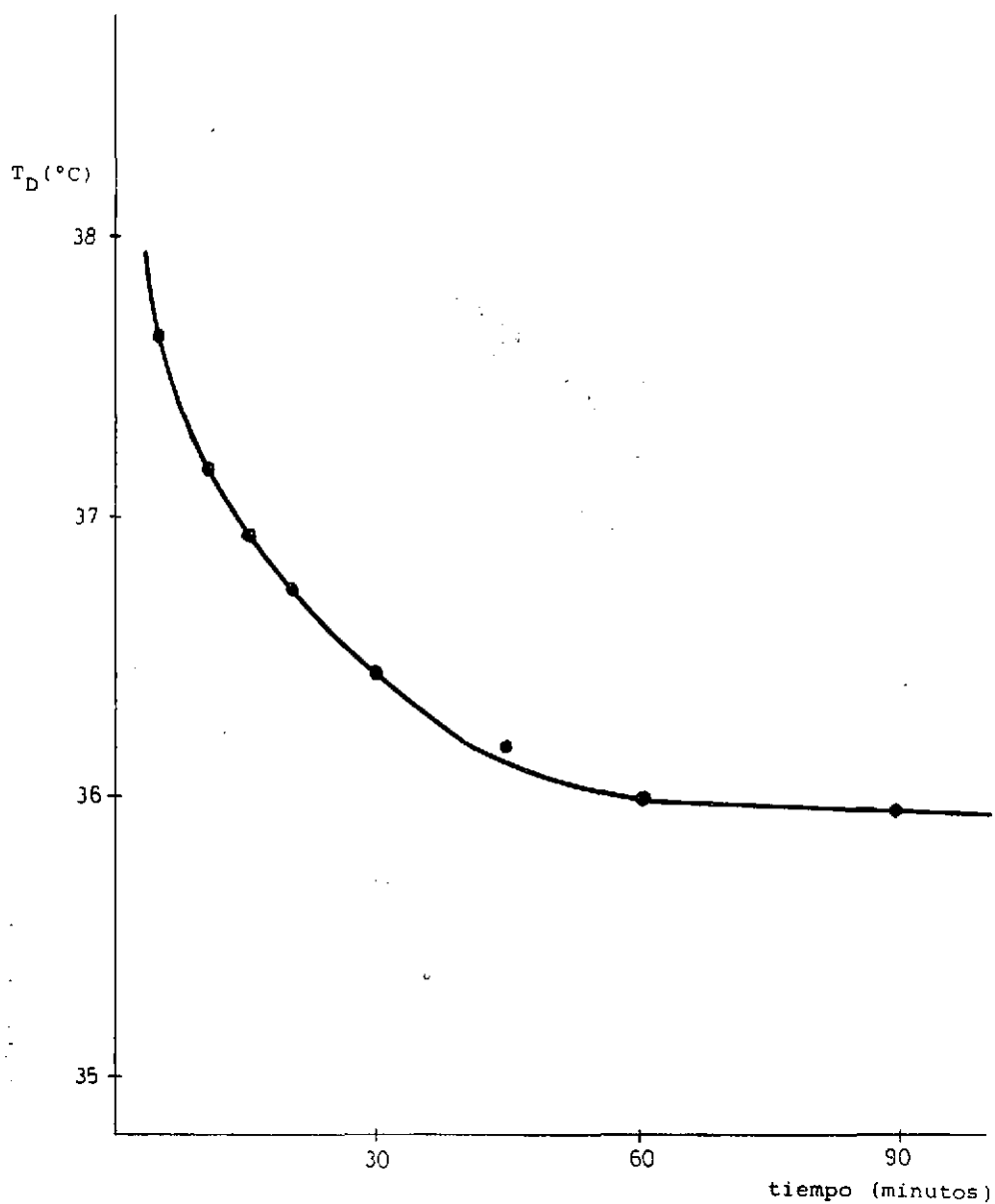


FIGURA 3.—Variación de la temperatura de desaturación (T_D) con el tiempo de calentamiento

TABLA III

PORCENTAJES DE PROTEÍNA EN ESTADO NATIVO, P_N , Y PROTEÍNA EN ESTADO DESNATURALIZADO, P_D , EXISTENTES DESPUÉS DE CALENTAMIENTO A LOS TIEMPOS Y TEMPERATURAS QUE SE INDICAN

Temperatura (°C)		Tiempo (minutos)							
		5	10	15	20	30	45	60	90
30	P_N	100	100	99,86	100	99,86	99,72	99,79	99,86
	P_D	0	0	0,14	0	0,14	0,28	0,21	0,14
36	P_N	95,04	86,97	76,91	71,03	61,90	53,90	50,85	45,82
	P_D	4,96	13,03	23,09	28,97	38,10	46,10	49,15	54,18
37	P_N	80,67	60,55	49,58	43,70	30,45	22,52	16,93	12,75
	P_D	19,33	39,45	50,42	56,30	69,55	77,48	83,07	87,25
38	P_N	34,28	13,95	9,70	5,74	1,49	1,35	0	0,07
	P_D	65,72	86,05	90,30	94,26	98,51	98,65	100	99,93
39	P_N	11,47	0,66	0,07	0	0	0,07	0	0
	P_D	88,53	99,34	99,93	100	100	99,93	100	100
41	P_N	0,14	0	0,07	0	0	0	0,07	0
	P_D	99,86	100	99,93	100	100	100	99,93	100

El cálculo de la entalpía de desnaturalización debe hacerse utilizando valores de porcentajes de proteína nativa y desnaturalizada correspondientes al tránsito en este proceso de desnaturalización. De acuerdo con ello, utilizamos las temperaturas de 37, 38 y 39° C para el tiempo de calentamiento de 5 minutos y de 36, 37 y 38° C para los tiempos de calentamiento de 10, 15 y 20 minutos. Para tiempos de calentamiento superiores, los porcentajes de proteína nativa y desnaturalizada están muy cercanos al 0 % y 100 %, respectivamente, lo que hace poco fiables los resultados obtenidos.

Calculadas las entalpías de desnaturalización para los distintos tiempos de calentamiento (tabla IV), puede observarse que la entalpía de desnaturalización resulta independiente de la velocidad de calentamiento, pudiéndose considerar como valor medio de los obtenidos el de 1,14 cal/g.

TABLA IV

ENTALPIAS DE DESNATURALIZACION DE COLAGENO DE TERNERO OBTENIDAS PARA LAS DISTINTAS VELOCIDADES DE CALENTAMIENTO

Tiempo (minutos)	Pendiente	$\Delta H_D (\text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta H_D (\text{cal} \cdot \text{g}^{-1}) (*)$
5	— 72,871	333,461	1,11
10	— 77,562	354,927	1,18
15	— 71,641	327,832	1,09
20	— 77,158	353,075	1,17

(*) Valores calculados considerando un peso molecular medio para la molécula de colágeno de 300.000.

El cálculo de la *entropía de desnaturalización* —variación entrópica consecuencia de la mayor libertad configuracional que supone la transformación de una estructura triple hélice en tres cadenas desordenadas— puede realizarse a partir de la ecuación $\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$, admitiendo que en el punto de transición, es decir, cuando la temperatura y la entalpía son las correspondientes a la desnaturalización (T_D , ΔH_D) la variación de energía libre es cero ($\Delta G = 0$) (5). De ahí que $\Delta S_0 = \frac{\Delta H_D}{T_D}$, de donde se obtiene un valor de $1,108 \frac{\text{Kcal}}{\text{mol. } ^\circ\text{K}}$ para la entropía de desnaturalización.

BIBLIOGRAFIA

1. YOUNG, E. G., y LORIMER, J. W., *Archs. Biochem. Biophys.*, 88 (1960), 373.
2. GALLOP, P. M., y SEIFTER, S., *Meth. Enzimol.*, 6 (1963), 635.
3. GALLOP, P. M., *Archs. Biochem. Biophys.*, 54 (1955), 486.
4. KRAGH, A. M., *Anal. Methods Prot. Chem.*, 3 (1960), 175.
5. CANTOR, CH. R., y SCHIMMEL, P. R., *Biophysical Chemistry*, parte 3.ª, cap. XX, pág. 1052, Ed. W. H. Freeman and Co., San Francisco, 1980.